

15.02.99

2999/638

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 06 APR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 2月15日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第050137号

出 願 人

Applicant(s):

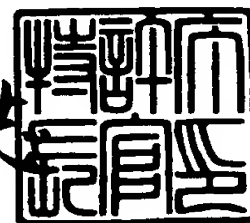
財団法人化学及血清療法研究所

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 3月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 彦



出証番号 出証特平11-3015161

【書類名】 特許願

【整理番号】 P10-002

【提出日】 平成10年 2月15日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光殿

【国際特許分類】 A61K 37/00
C12N 9/00

【発明の名称】 新規な免疫異常性疾患予防・治療用薬剤

【請求項の数】 12

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市石原町 301-72

 【氏名】 佐々木 巧

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市武蔵ヶ丘4丁目18 3-404

 【氏名】 来海 和彦

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市龍田町上立田1265-4 雇用促進住宅
1-407

 【氏名】 副島 見事

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡菊陽町津久礼4213-6 シャトレ向陽台
205

 【氏名】 木村 由美

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市武蔵ヶ丘1丁目444

 【氏名】 野崎 周英

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県大津市南郷2丁目41-22

 【氏名】 藤山 佳秀

【特許出願人】

【識別番号】 000173555
【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号
【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
【代表者】 酒匂 光郎

【手数料の表示】

【納付方法】 特許印紙
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な免疫異常性疾患予防・治療用薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 T細胞レセプター（以下、TCRと称することがある）の特異的V β 成分と相互作用するが、天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B（以下、SEBと称することがある）や組換え野生型SEBが有する特定のV β 成分をもつT細胞の除去、を誘導することなくSEBに対する反応性のみ低下させるアナジーを誘導し得るSEB改変体またはその誘導体（以下、これらをSEBsと総称することがある）を必須有効成分とする、免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 2】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のアミノ酸で置換されているものである請求項 1 記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 3】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギンで置換されているものである請求項 2 記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 4】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がアスパラギン以外のアミノ酸で置換されているものである、請求項 1 記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 5】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がアスパラギン酸、イソロイシンまたはリジンで置換されているものである、請求項 4 記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 6】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして41位のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸で置換されており、そして／または44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のアミノ酸にもしくは45位のアミノ酸がロイシン以外のアミノ酸に置換されているものである、請求項 1 記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項 7】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして41位のアミノ酸がアルギニンもしくはスレオニ

ンで置換されており、そして／または44位のアミノ酸がバリンにもしくは45位のアミノ酸がバリンに置換されているものである、請求項6記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項8】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換されているものである、請求項1記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項9】 SEB改変体またはその誘導体が、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がセリンに置換されているものである、請求項8記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項10】 経口投与用薬剤である請求項1～請求項9のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項11】 生理学的に許容しうるpH及び許容しうる強度のイオン強度を有する水溶液である請求項1～請求項10のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【請求項12】 生理学的に許容しうる張度を溶液に与えるのに十分な量で、炭水化物、糖、糖アルコールおよびアミノ酸より群から選ばれる物質を含有する請求項1～請求項11のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、新規な免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤に関する。さらに詳細には、スーパー抗原として知られる黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (Staphylococcal enterotoxin B; 以下、SEBと呼称することもある)から、食中毒を引き起こす程度の毒性を除去したSEB改変体またはその誘導体を主たる有効成分とする慢性関節リウマチ、アレルギー性疾患等の免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; 以下、RAと称することがある) 等の臓器非特異的自己免疫疾患及び潰瘍性大腸炎のような臓器特異的自己免疫疾患は、通常は免疫学的寛容の状態にある自己の抗原に対して応答するT細胞が、何らかの原因で自己の組織内で活性化され自己の抗原と応答するようになり、これが持続的な炎症反応となって組織に障害を与えることに起因する。この場合、抗原は自己の関節の成分であるII型コラーゲンや消化管粘膜の主成分である。

これら疾患の患者数は毎年、僅かながら増加しているにも拘わらず、今なお有効な治療薬や予防方法は見出されていない (山村雄一、岸本忠三、ロバート・A・グッド編：薬剤による免疫不全、「免疫科学」、9巻、p.285-289、(1984))。現在、これらの疾患の治療には、サラゾピリン、5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、6-MP、胸腺摘出術、トラニラスト、メトトレキシサート、7S-免疫グロブリン大量投与療法、成分栄養、並びにシクロスポリンA及びメトロダニゾール等の免疫抑制剤の薬物療法が対症療法的に行われている (市川陽一ら：慢性関節リウマチにおけるメトトレキシサートおよびサラゾスルファピリジン長期投与例の検討、リウマチ、35巻、p.663-670、(1995)；柏崎禎夫：慢性関節リウマチに対するオーラノフィンとメトトレキシサートによる併用療法の検討、リウマチ、36巻、p.528-544、(1996)；古谷武文ら：慢性関節リウマチにおける低用量メトトレキシレート療法の有害事象、リウマチ、36巻、p.746-752、(1996)；渡辺言夫：若年性関節リウマチの薬物療法、リウマチ、36巻、p.670-675、(1996)；八倉隆保：免疫抑制療法・自己免疫疾患の治療 総合臨床、30巻、p.3358、(1981)；都外川新ら：慢性関節リウマチにおけるメトトレキシサート療法の検討ー有効性のよりたかい投与法を求めてー、リウマチ、37巻、p.681-687 (1997))。しかしながら、これらは根治的な療法とは言えず、むしろ長期服用による重篤な副作用の原因ともなり、より有効な予防・治療薬、治療法の開発が望まれている。

【0003】

SEBは周知のように細菌性スーパー抗原の一種である (White J. et al. Cell, vol.56, p.27-35, 1989)。通常の抗原はクラ

スII主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex: 以下、MHCと称することもある。) と複合体を形成した状態でT細胞上のT細胞抗原受容体 (T cell antigen receptor: 以下、TCRと称することもある。) に認識され、しかもその認識はクラスIIMHCのハプロタイプに限定される(これをMHC拘束性という)。これに対して、スーパー抗原はクラスIIMHC分子にハプロタイプに関係なく結合し、さらに特定のTCRの β 鎖可変領域($V\beta$ 鎖)に結合する。このような結合が生じると、スーパー抗原が結合したT細胞は一時的に活性化され分裂増殖を引き起こし、炎症性のサイトカインを産生する(Micusan V.V. & Thibodean J, Seminars in Immunology, vol. 5, p.3-11, 1993)。

【0004】

SEBは食中毒を起こす毒素の一つであるが、食中毒様の症状はSEBを動物に静脈内投与しても認められることからSEBの上記生物活性を介して、毒性が発現されていることが示唆される(Micusan V.V. & Thibodean J, Seminars in Immunology, vol. 5, p.3-11, 1993)。

ところが、スーパー抗原を新生マウスに静脈内或いは腹腔内に投与すると、これに応答する $V\beta$ 鎖(SEBでは $V\beta 7$ 及び $V\beta 8$ TCR)を持ったT細胞亜集団は除去され、同じ抗原に対して応答しなくなる免疫寛容の状態になる(White J. et.al.Cell, vol.56, p.27-35, 1989)。一方、SEBを成体のマウスに投与した場合は、前述のような一時的な活性化の後に応答性の $V\beta 7$ 、 $V\beta 8$ TCRを持つT細胞亜集団は、再度のSEBの刺激に対して応答しなくなる状態、即ちアナジーの状態が誘導されて免疫寛容になる。このようなSEBの活性は前に述べた慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎のような難治性の自己免疫疾患、さらには免疫異常性疾患のより副作用の少ない予防・治療用薬剤になる可能性があることは、本願発明者らがすでに特許願平成7年第297548号(特開平9-11070)で主張している通りである。

【0005】

先の出願では、SEBのもつ毒性を回避し免疫異常性疾患に対する有効性を保

持する方法として、経口投与剤としての利用方法を開示した。

また、SEBの毒性を回避する方法としては、カップラー及びマラーックらが特開平8-500328で開示している「突然変異したスーパー抗原の保護作用」があり、彼らの発明の骨子は以下のものである。SEBの突然変異体を調製し精製した後、ヒトのクラスII MHC分子及びTCRに結合可能なSEB突然変異体を選択した。その後、突然変異していないSEBと区別できないほどにクラスII陽性細胞に結合し、T細胞の増殖を刺激しないSEB突然変異体をSEBに暴露する前に動物に注射するとSEBの毒性作用に対して完全な防御を示した。

【0006】

特開平8-500328の開示がもたらす特に重要な知見は、毒性除去に関わるSEBの構造研究である。SEBの3次元構造はスワミノサンら(Nature, vol.359, p.801, (1992))によって報告された。SEB分子は2つのドメインから構成され、最初のドメインは残基1-120よりなり、2番目は残基127-239よりなる。これらについては、クラスII MHC分子及び/またはT細胞活性化に影響を与えるSEBのN-末端部分に存在する3つの領域が同定されている。これらの領域に関与する特異的アミノ酸が特定され、これらはクラスII MHC結合とT細胞活性化に影響を与え、他はT細胞活性化のみに影響を与える。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上述の知見に着目し、本願発明者らは、本来のSEBの有する毒性を軽減し免疫異常性疾患の予防・治療に効果を発揮し得るSEB改変体及びそれらの誘導体を本態とする新規な免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤を提供する本願発明を完成した。

本願発明では、SEB改変体のうち特にクラスII MHC分子への結合に影響を与えるものについて鋭意検討を重ねた。スーパー抗原とクラスII MHCとの結合は、スーパー抗原によるT細胞活性化に必須であるため直接TCR結合部位に影響を与えずとも、T細胞のSEBに対する応答性が低下する可能性(アナジの誘導)が期待された。

【0008】

9-23のアミノ酸残基として定義される領域1では、特に重要なクラスII MHC分子への結合を妨害する23位の改変(N23D、N23K、N23Y、N23I)について重点的に検討した。また、9位及び17位のD9N及びF17Sについても同様に調べた。なお、本願明細書に用いられる改変に係る表記は、例えばN23Dの場合、N末端から23番目(23位)のNをDに置換した改変体を意味し、以下同様に表した。

残基40-53で定義される領域2は、全ての黄色ブドウ球菌の腸管内毒素においてクラスII MHC分子への結合を仲介するのに重要である。ここで41位、44位、45位及び53位の変異について検討した。これらの残基はクラスII MHC分子への結合に特異的である。残基41、44、45、53位及び59位に点突然変異を導入し改変体を作製した。即ち、I41TL45V、I41RF44V、F44S、F44LI53N、F44LI53NG59Wである。

【0009】

上述のSEB改変体について後述の方法でその安全性と有効性について検討した結果、以下の態様のSEB改変体が、慢性関節リウマチ等の免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤の本態として安全で、かつ良好な機能を発揮し得ることを確認した。

- ①天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のアミノ酸で置換されているSEB改変体またはその誘導体。
- ②天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のアミノ酸で置換されているSEB改変体またはその誘導体。
- ③天然型SEBを基準にして41位のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸で置換されており、そして／または44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のアミノ酸にもしくは45位のアミノ酸がロイシン以外のアミノ酸に置換されているSEB改変体またはその誘導体。
- ④天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換されているSEB改変体またはその誘導体。

さらに、これらのSEB改変体の本態とする薬剤において、とりわけ、経口投

与ルートでの投与形態が驚くべき効果をもたらすことを確認した。

【0010】

まず体重減少誘発を指標とした毒性の低減について検討した。体重減少はBALB/cマウスを用いて行なった。含まれるエンドトキシンを実験に影響を与えない濃度に除去したSEB 300 μ gをPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)に溶解し、マウスに腹腔内投与し、翌日より各個体の体重測定を行なった。結果は、野生型SEB及びD9N-SEBでは7~9%の体重減少が投与後3日まで認められたが残り全ての改変体では体重減少は認められなかった。

【0011】

さらに、本願発明者はこれら改変体について、D-ガラクトサミン誘導致死毒性の有無について検討した。D-ガラクトサミンを投与するとSEBに対するマウスの感受性が著しく上昇し、雌のBALB/cマウスに投与した場合LD50が2 μ g/マウスまで低下し、20 μ g/マウスでは100%死亡することをMiethe Tらが報告している(J. Exp. Med., vol. 175, p. 91-98, (1992))。

本願発明者は、この実験系を用いて改変体の致死毒性の有無について検討した。その結果、野生型とD9Nでは48時間後の死亡率が9/10、8/10であったのに対して、それぞれの改変体について、I41TL45Vが3/10、I41RF44Vが1/10、F44Sが0/10、F44LI53Nが0/10、F44LI53Nが1/10、そしてF44LI53NG59Wが0/10であり、これらの改変体では致死毒性は著しく低減されていることが判明した。これは、特開平8-500328で開示された毒性低減のみならず、致死毒性も除去できることを明確に示している。

【0012】

ところで、免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤としての可能性が期待されるSEBであるが、この物質そのものが免疫異常性疾患の発症に関与しているとの報告がある(Omata S, et al., Cellular Immunol., Vol. 179, p. 138-145, (1997))。そこで、SEBそのもの及び本願発明のSEB改変体の免疫異常性疾患発症との関連について、ヒトの慢性関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎(CIA)の系を用いて検討した

。コラーゲンを投与して関節炎を誘導したマウスに、天然型 S E B 及び本願発明によって提供される代表的な S E B 改変体を追加投与すると、天然型 S E B を投与されたマウス群では関節炎の発症率が高度に高く、その重症度も高度であって、発症と S E B との関連が否定できないデータが得られたのに対して、S E B 改変体の投与では重篤な発症を生じることにはなかった。

【0013】

さらに、前述の実験系で関節炎の発症に深く関与する天然型 S E B の投与に先立ち、本願発明の S E B 改変体を投与しておく、と、重篤な関節炎の発症を防御し得るという、S E B 改変体投与の優れた効果を支持する結果が得られた。

【0014】

本願発明のこれら S E B 改変体について経口投与による自己免疫疾患治療薬への応用の可能性について、コラーゲン誘導関節炎(C I A)の系で検討した。その結果、野生型、I 41 T L 45 V、I 41 R F 44 V、F 44 L I 53 N G 59 W、F 44 S、N 23 Y、N 23 I、N 23 D-S E B s は関節炎の増悪を抑制することが判明し、有効性が保たれていることが確認された。従って、本願発明によってもたらされる S E B 改変体を本態とする薬剤は、従来のもものと比べて毒性の低い慢性関節リウマチの予防・治療用薬剤、特に経口投与剤として利用可能である。また、特許願平成 7 年第 2 9 7 5 4 8 号で開示される天然型 S E B で示されているような炎症性腸疾患に対する発症予防効果も期待できる。

本願発明の最適な実施態様である免疫異常性疾患の予防・治療用経口投与剤は、その本態である高度に精製された S E B 改変体を他の投与形態の薬剤に比べて極めて少量含有することを特徴とする。これら S E B 改変体は S E B と同様に S E B 結合性の V β T C R T 細胞亜集団に特異的に弱いトレランスを誘導するが、一方で、経口投与した場合、炎症性の T 細胞の作用を抑制する働きを有している。

【0015】

本願発明に使用される改変体を調製する方法は特に限定されないが、遺伝子組み換え技術によって得られる S E B s 産生細胞より分離する方法によって調製することができる。

例えば、本願発明の薬剤の本態となる S E B 改変体の基本的な態様である野生

型SEB（黄色ブドウ球菌に由来するSEBと同じアミノ酸配列を有する遺伝子組換え技術に基づいて調製されたSEB）は概略、以下の方法で調製する。

SEBの染色体DNAは公知であるので（Ranelli D.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.82, p.5850～(1985)）、DNA合成機等を用いて5'センスプライマー及び3'アンチセンスプライマーを合成することができる。該プライマーと市販されているSEBのDNAライブラリーに存する染色体DNAによるブランクハイブリダイゼーションによりブランクを採取し、さらにセンスのプライマーを用いてPCRを行い、得られたバンドからDNAを抽出する。好適なクローニングベクターに抽出されたDNAを挿入してクローニングする。

【0016】

クローニングされたSEBをコードする遺伝子をSacI、HindIII、EcoRI、BamHI、XbaI、SalI及びPstI等の制限酵素で切断し、同じく制限酵素XmnI、HindIII、EcoRI、BamHI、XbaI、SalI及びPstI等で切断したベクターに組み込むことによって組換え体DNAを得る（Sambrookら、Molecular Cloning、第2版、第9章、1989年、New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press）。ベクターとしては、分泌発現用ベクターpTrc99A等が好適に用いられ得る。

【0017】

得られた組換え体DNAを適当な宿主例えば大腸菌に組み込むことにより、形質転換体を得ることができる。当該形質転換体を常法により培養した後、培養終了後に菌体を採取し、常法により菌体を破碎し懸濁液より所望の野生型SEBを得ることができる。なお、条件によっては培養上清中に好適に野生型SEBが分泌されている場合があり、この場合、培養上清が調製の出発原料となり得る。出発原料を、例えば、抗SEB単クローン抗体を吸着体に結合させた免疫アフィニティークロマトグラフィー等の精製手段により精製する。なお、各種試験に用いられる最終調剤の緩衝液は、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液等を用いることが好ましい。

【0018】

本願発明の、SEB改変体の調製は前述の野生型SEBの調製に準じる。ただし、SEBのX線構造解析データに基づく分析によりMHC class II分子との結合

部位を解析し、アミノ酸の特定の改変部位を決定して好適なプライマーを調製し、PCRによる点突然変異の操作を加えることが必須の要件となる。

【0019】

調製された野生型SEB及びSEB改変体を最大限に維持するためには、新鮮であるか、4℃で保存する場合は保存後約5日以内のものが好ましい。あるいは、本願発明のSEB改変体には、ゼラチン、塩、糖、糖アルコールまたはアミノ酸等の好適な環境で保存することができる。

また、本願発明では有効成分としてのSEB改変体もしくはその誘導体と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の免疫異常性疾患予防・治療用薬剤とすることができる。

【0020】

【発明の効果】

本願発明により、従来より強く望まれていた慢性関節リウマチ等の免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤を提供することが可能となる。

以下に、調製例及び実施例を挙げて本願発明を具体的に説明するが、本願発明はこれらの例に何ら限定されるものではない。

【0021】

【実施例】

調製例 1

(組換えSEB改変体の作製と発現)

1-1 SEB遺伝子のクローニング

CLONOTEC社よりStaphylococcus aureus enterotoxin A+B+DのDNAライブラリーを購入し、ブランクハイブリダイゼーション法を行った。プローブとして、アンチセンスの合成DNAあるいはPCR断片を用いた。プライマーは以後のクローニング操作を容易にするために両端にSal^I切断部位を付加した。

上記プライマーと結合したブランクを採取し、さらにセンスのプライマーを用いてPCRを行い、得られたバンドからDNAを抽出し、PCR-IIベクター(Invitrogen社)にクローニングした。上記ハイブリダイゼーションに用いたプライマーを表1に示す。

【0022】

【表1】

	アンチセンス:	5'-AAG	TCG	ACA	ATA	TTA	GAA	AAG	GCA	GGT	ACT-3'	
				Sal I								
	センス:	5'-ATG	TCG	ACT	TAA	TTG	AAT	ATT	TAA	GAT	TAT-3'	
				Sal I								

【0023】

その後、オートシーケンサーを使用して、DNAの塩基配列を確認した。得られたSEB遺伝子はプロモーター領域(SEB-Pro)を含んでいたもので、プロモーター領域を含まないSEB遺伝子を得るために更に、表2に記載のプライマーを用いてPCRを行い、得られたDNA断片をPCR-IIベクターにクローニングした。

【0024】

【表2】

	センス:	5'-AAG	TCG	ACA	AAA	AAT	GTA	TAA	GAG	ATT	ATT-3'	
				Sal I								
	アンチセンス:	5'-AAG	TCG	ACT	TTC	ACT	TTT	TCT	TTG	TCG	TAA-3'	
				Sal I								

得られたSEB遺伝子のDNA塩基配列は、オートシーケンサーを用いて決定したが、上記のようにして得られたSEB遺伝子には突然変異は含まれていなかった。プロモーター領域を含まないSEB遺伝子を、Sal Iで切断し、同じ切断部位を持つ分泌発現用ベクターpTrc99A(Pharmacia Biotech社)にクローニングし、正常な方向に挿入されているものを使用して、IPTGを用いた誘導を行い、SEBが分泌発現されることを確認した。

【0025】

1-2 ポリメラーゼチェーン反応(PCR)

本実施例では、PCRはSaikiら(Science vol.,239, p.487, (1988))の報告に従い、TaqポリメラーゼとPerkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, USA)のDNAサーマルサイクラーを用いて行った。2本鎖テンプレートDNAを変性解離させるための1分間の変性工程、プライマーとテンプレートを会合させるための2分間のアニーリング工程及び合成のための2分間の延長工程を30-35サイクル行った。テンプレート濃度は1-10Mであり、オリゴヌクレオチドプライマー濃度は1mMとした。dNTPの濃度は200mMであるが、突然変異を導入する場合は1つのdNTP濃度を20mMに低下させた。

【0026】

1-3 組換えSEB改変体の作製と発現

SEB改変体は、アミノ酸置換導入を行ったものののみ組換え発現した。Marrack, p. et al (J Exp. Med. vol.,171 p. 445, (1990))の報告に基づき、MHC class II分子に対する結合力に影響を与える領域を改変した。表3にアミノ酸置換の導入部位について示す。

【0027】

【表3】

改変位置	変化	呼称
D 9	Asn→Asp	D9N
F 17	Phe→Ser	F17S
N 23	Asn→Asp	N23D
N 23	Asn→Tyr	N23Y
N 23	Asn→Ile	N23I
N 23	Asn→Lys	N23K
D 9, N 23	Asp→Asn, Asn→Asp	D9NN23D
F 44	Phe→Ser	F44S
F 44, I 53	Phe→Ile, Ile→Asn	F44LI53N

F 44, I 53, G 59	Phe→Leu, Ile→Asn, Gyr→Trp	F44L I53N G59W	
I 41, F 44	Ile→Arg, Phe→Val	I41R F44V	
I 41, L 45	Ile→Thr, Leu→Val	I41T L45V	

【0028】

1-4 アミノ酸置換の導入

PCR IIベクターに挿入したSEB-Pro遺伝子を鋳型DNAとして、5'末端にSfiI部位を、3'末端にNotI部位をPCRを用いて付加した。得られたDNA断片をpTrc99A pelBベクターに挿入し、塩基配列をシーケンシングして確認した。各SEB改変体のアミノ酸置換導入位置の遺伝子に本来のアミノ酸が目的とするアミノ酸に変換されるように塩基配列に変異を入れたPCR用プライマーをセンス側及びアンチセンス側それぞれ1本ずつ合成した。まずアンチセンス側のプライマー(D9N, N23I, N23Y, N23D, N23K, F17S, F17SN23D)-SEBを用いて先に作製し、SfiI部位付加用プライマーをセンスプライマーにしてPCRを行った。

【0029】

図1及び図2にそれぞれの改変体に用いたPCRプライマーの塩基配列を示す。

次に、センスプライマーを用いて先に作製したNotI部位付加用プライマーをアンチセンスプライマーとしてPCRを行った。得られた2本のDNA断片を使用してPCRを行い、得られたDNA断片をpTrc99Aにクローニングした。その後SfiIとNotIで挿入されたベクターを処理して目的とするサイズのDNA断片に切断されるか調べ、切断されたものについてDNA塩基配列のシーケンシングを行い変異の導入が正確になされているかどうか確認した。

【0030】

1-5 SEB改変体の発現及び該改変体の調製

SEB改変体の発現はpTrc99Aベクターに挿入された改変体遺伝子を用いて行った。遺伝子を組み込んだ大腸菌を4% CIRCLEGROW (BIO 101 Inc., Vista, CA, USA)、アンピシリン(50mg/ml)を溶かした培地で37℃18時間培養し

、細胞を集めた後、さらに同じ培地に、0.D.550nmが0.3~1.0になるように調整して浮遊し、2mMisopropyl-b-D(-)-thiogalactopyranoside(IPTG)を加えて37℃で一晩振とうすることにより誘導を行った。誘導後、遠心分離により宿主の大腸菌を除去し、0.45mmの濾過膜で濾過した。

このようにして調製した培養上清を、抗SEB単クローン抗体SA58-2-6IgGを固相化したSephrose4Bカラムに通液し、含まれるSEB改変体を吸着させた。0.1M Tris HCl (pH8.0)で洗浄したのち、4M MgCl₂で溶出した。溶出画分は、20倍容の生理食塩水に3回透析後、20倍容のPBSに2回透析した。今回調製したSEB改変体は全てこの単クローン抗体カラムで精製することが可能であった。

【0031】

実施例 1

(マウスを用いた致死毒性試験)

Miethke Tらが報告しているように、天然型SEBは通常はマウスに致死毒性をもたらさないが、これにD-galactosamineを20μg/kgで投与し、さらに20μg/マウスのSEBを投与静脈内若しくは腹腔内に投与することで、死亡することが知られている(J. Exp. Med. vol.,175, p.91-98, (1992))。本発明では予めD-galactosamineを投与したマウスに引き続きSEB及びSEB改変体を投与して、これらが実際に死亡率を改善するものであるかどうかを調べた。

【0032】

先ず、エンドトキシンに対する感受性をBALB/cマウス、D-gaslactosamine 20mg/マウスを投与後、E.coli B4株由来のLPS(lipopolysaccharide)を静脈内投与して24時間後の死亡率を調べた。その結果、LPS投与量が1ng/マウス以下では死亡例は0であった(表4)。

【0033】

【表4】

投与量	死亡個体数/全個体数

1 μ g/head	7/9	
100 ng/head	8/9	
10 ng/head	5/9	
1 ng/head	0/9	
0.1 ng/head	0/9	

【0034】

SEB 改変体標品中に含まれるエンドトキシンの量を最終投与量が 10 ng/マウス以下になるように除去し、雄を使用して実験を行った。雄では、D-galactosamine 投与後の SEB の致死毒性は 100 μ g/マウス以上を投与したときに発現されたので、SEB 改変体の投与量は 100 μ g/マウスとした。表 5 に示すように、天然型 SEB、野生型 SEB 及び D9N-SEB ではマウスの死亡率は高く、致死毒性があることが示されたが、他の改変体では致死毒性は低減されていた。なお、ここでいう天然型 SEB とは黄色ブドウ球菌に由来する腸管内毒素を意味し、野生型 SEB は天然型 SEB とアミノ酸配列を同じくする遺伝子組換え技術に基づいて調製された SEB を意味する。

【0035】

【表 5】

SEB 改変体 s (100 μ g/head)	死亡率(合計死亡個体数/全個体数)		
	24 時間後	48 時間後	
天然型	8/10	8/10	
野生型	7/10	9/10	
D9N	6/10	7/10	
I41TL45V	3/10	3/10	
I41RF44V	0/10	0/10	
F44LI53N	0/9	0/9	
F44LI53NG59W	0/10	0/10	

F44S	0/10	0/10	
N23I	0/10	0/10	
N23D	0/10	0/10	
N23Y	0/10	0/10	
N23K	0/10	0/10	
PBS	0/10	0/10	

【0036】

次に、雌のBALB/cマウスを用いて実験を行った。雌ではD-galactosamine 40 mg/マウスを投与したとき、SEB 20 μ g/マウスで高い致死毒性が認められた。天然型-SEB、野生型-SEB、D9N-SEBでは高い死亡率となったが、その他の改変体では死亡率は低く、致死毒性が低減されていることが示された。

【0037】

実施例 2

(コラーゲン誘導関節炎でのSEB改変体の安全性の評価)

コラーゲン誘導関節炎(collagen-induced arthritis; 以下、CIAと呼称することがある。)は、DBA/1マウスに、ウシII型コラーゲンをフロイント完全アジュバントとともに、200 μ g/マウスで皮内投与し誘導した。ウシII型コラーゲン投与より21日後にSEB、F44SまたはN23Dを各々50 μ g/マウスの投与量で腹腔内投与し、一週間後(初回のコラーゲンの投与より28日後)に関節炎の発症率を比較した。表6に関節炎発症率と重症度について結果をまとめる。SEBを投与されたマウスでは強力な関節炎が8例中5匹に観察されたが、これに対し、F44SまたはN23Dの投与群のマウスには1例も関節炎は認められなかった。

【0038】

【表6】

1次免疫	ブースター	発症率	重症度

	コラーゲン	SEB	5/8	6.2	
	コラーゲン	F44S	0/8	—	
	コラーゲン	N23D	0/8	—	

【0039】

実施例 3

(SEB誘導性関節炎におけるSEB改変体の予防効果)

実施例2と同様の方法で誘導したDBA/1マウスに、ウシII型コラーゲン投与より18日後、F44SまたはN23Dをそして対照としてリン酸緩衝液を各々50 μ g/マウスの投与量で腹腔内投与した。さらに3日後に50 μ g/マウスのSEBを腹腔内投与した。表7にリン酸緩衝液投与群では8例中4例(50%発症率)のマウスに関節炎が認められたが、F44SまたはN23Dを前投与することによって、発症率はそれぞれ13%及び25%に抑制された。

【0040】

【表7】

	1次免疫	前処置	ブースター	発症率	重症度	
	コラーゲン	PBS	SEB	4/8	6.5	
	コラーゲン	F44S	SEB	1/8	5.0	
	コラーゲン	N23D	SEB	2/8	2.5	

【0041】

実施例 4

(コラーゲン誘導関節炎でのSEB改変体の経口投与による有効性の評価)

実施例2と同様にしてCIAを誘導したDBA/1マウスに、その後21日後にウシII型コラーゲンをそのまま腹腔内投与するブースターを行った。CIAの発症は関節炎スコアを測定し、重症度を比較し、実験開始時点での疾患の重症度を一定にそろえた。経口投与は、予め計算したマウス1日の飲水量を調べ平均飲水

量を計算し、適度にバラツキがでるように群分けしたものをを用いた。

【0042】

群分け後、SEB 改変体を自由飲水投与し、疾患の軽減を見る実験を開始した。毎週 1 回スコアを読み、重症度の推移を記録した。これらの結果を図 3 及び図 4 に示す。CIA の症状軽減、増悪抑制活性については、I41RF44V、I41TL45V、D9N、N23K、F44S、N23I 及び野生型 SEB について有効であった。各実験群の関節炎スコアを基に PBS (CIA 発症群) 投与群と改変体投与群との間でウイルコクソン検定による有意差検定を行った。その結果、上記の改変体投与群すべてにおいて、発症からの経過日数が 25 日～75 日の間は 0.05 以下の危険率で有意であり、これらの改変体は CIA で症状軽減効果があることが判った。従って、毒性が低減されかつ CIA での有効性が保持されている SEB 改変体の有効性が確認され、これらは副作用の極めて少ないヒトの慢性関節リウマチの治療用経口投与剤としての可能性が高いことを示唆している。

一方、D9NN23D、F17SE22D 及び N23YF208L の投与群では PBS 投与群との比較で、ウイルコクソン検定において 0.05 の危険率で有意差はなかった。

【0043】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

アンチセンス：Yes

配列

AAGTCGACAA TATTAGAAAA GGCAGGTACT

【0044】

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

ATGTCGACTT AATTGAATAT TTAAGATTAT

【0045】

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

AAGTCGACAA AAAATGTATA AGAGATTATT

【0046】

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

AAGTCGACTT TCACTTTTTT TTTGTCGTAA

【0047】

配列番号：5

配列の長さ：66

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAAA

CGAGTTGCAC AAATCG

【0048】

配列番号：6

配列の長さ：104

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAGA

TGAGTTGCAC AAATCGAGTA AATTCAGTGG TTTGATGGAA ATTATGAAAG TTTT

【0049】

配列番号：7

配列の長さ：104

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAGA TGAGTTGCAC

AAATCGAGTA AATTCAGTGG TTTGATGGAA AAAATGAAAG TTTT

【0050】

配列番号：8

配列の長さ：104

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAGA TGAGTTGCAC
AAATCGAGTA AATTCAC TGG TTTGATGGAA TATATGAAAAG TTTT

【0051】

配列番号：9

配列の長さ：104

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAGA TGAGTTGCAC
AAATCGAGTA AATTCAC TGG GATATGAAAAG TTTT

【0052】

配列番号：10

配列の長さ：104

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAAA CGAGTTGCAC
AAATCGAGTA AATTCAC TGG GATATGAAAAG TTTT

【0053】

配列番号：11

配列の長さ：90

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CTCGCGGCC AGCCGGCCAT GGCCGAGAGT CAACCAGATC CTAAACCAGA TGAGTTGCAC
AAATCGAGTA AATCCACTGG TTTGATGGAA

【0054】

配列番号：12

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

AAATCTATAG ATCAATCTCT ATACTTTGAC TTA

【0055】

配列番号：13

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

TAAGTCAAAG TATAGAGATT GATCTATAGA TTT

【0056】

配列番号：14

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

TCTATAGATC AATTGTATA CTTGACTTA ATA

【0057】

配列番号：15

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

TATTAAGTCA AAGTATACAA ATTGATCTAT AGA

【0058】

配列番号：16

配列の長さ：42

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

ATAAACGTTA AATCTCGTGA TCAAGTTCTA TACTTTGACT TA

【0059】

配列番号：17

配列の長さ：42

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Y e s

配列

TAAGTCAAAG TATAGAACTT GATCACGAGA TTAAACGTTT AT

【0060】

配列番号：18

配列の長さ：60

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：N o

配列

AAATCTATAG ATCAACTGCT ATACTTTGAC TTAATATATT CTAACAAGGA CACTAAGTTA

【0061】

配列番号：19

配列の長さ：60

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Y e s

配列

TAACTTAGTG TCCTTGTTAG AATATATTAA GTCAAAGTAT AGCAGTTGAT CTATAGATTT

【図面の簡単な説明】

【図1】本願発明のSEB改変体調製時のアミノ酸置換に用いたそれぞれの改変体に応じたPCRプライマーの塩基配列を示す図である。

【図2】本願発明のSEB改変体調製時のアミノ酸置換に用いたそれぞれの改変体に応じたPCRプライマーの塩基配列を示す図である。図1の続き

【図3】コラーゲン誘導関節炎でのSEB改変体の経口投与による有効性を示した図であり、有効であった投与群のものである。縦軸は被験マウスの重症度

、横軸は発症してからの経過日数を示す。

【図4】コラーゲン誘導関節炎でのSEB改変体の経口投与による有効性を示した図であり、無効であった投与群のものである。縦軸は被験マウスの重症度、横軸は発症してからの経過日数を示す。

特平 1 0 — 0 5 0 1 3 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特平 1 0 — 0 5 0 1 3 7

【書類名】

図面

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【図 1】

D 9 N-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA AAC GAG TTG CAC AAA TCG

N 23 I-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA ATT ATG AAA GTT TT

N 23 K-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA AAA ATG AAA GTT TT

N 23 Y-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA TAT ATG AAA GTT TT

N 23 D-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA GAT ATG AAA GTT TT

D 9 NN 23 D-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA AAC GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA GAT ATG AAA GTT TT

【図2】

F 17 S-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TCC ACT GGT TTG
ATG GAA

F 44 S-S E B

センス : AAA TCT ATA GAT CAA TCT CTA TAC TTT GAC TTA
アンチセンス : TAA GTC AAA GTA TAG AGA TTG ATC TAT AGA TTT

I 41 T L 45 V-S E B

センス : TCT ATA GAT CAA TTT GTA TAC TTT GAC TTA ATA
アンチセンス : TAT TAA GTC AAA GTA TAC AAA TTG ATC TAT AGA

I 41 R F 44 V-S E B

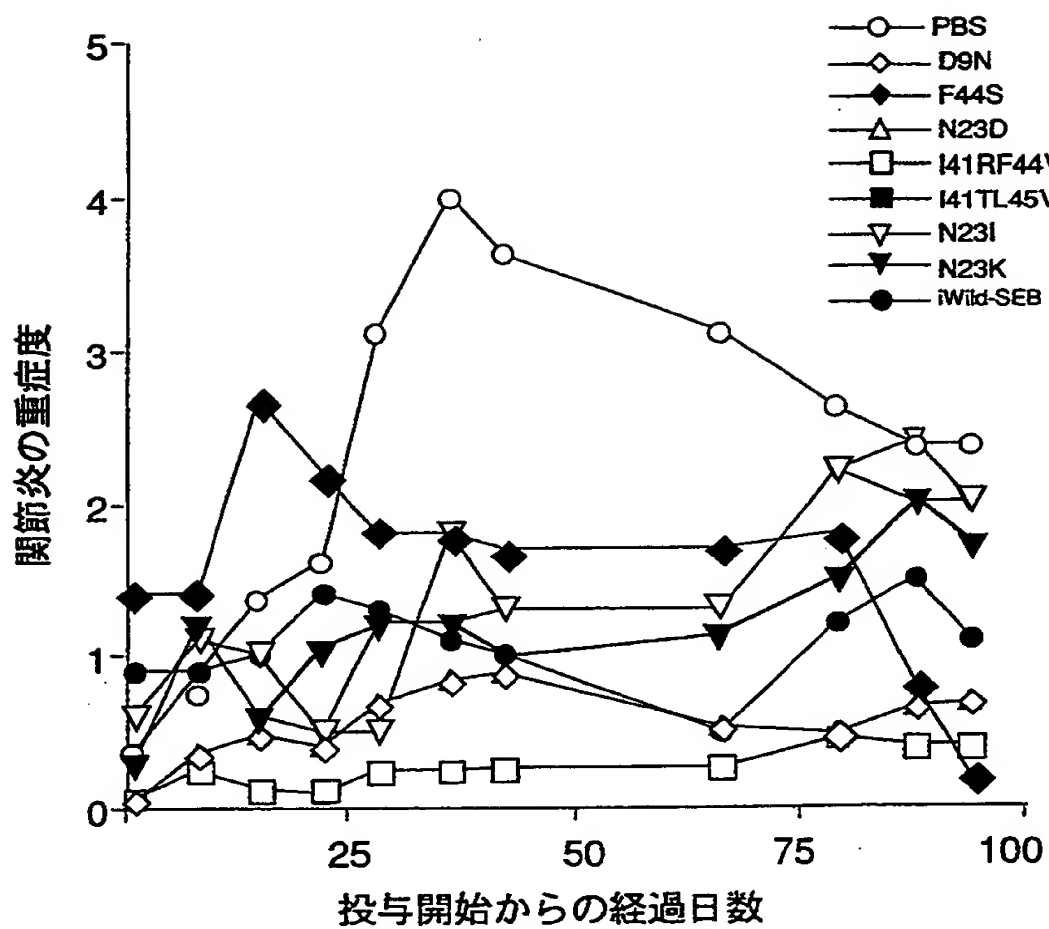
センス : ATA AAC GTT AAA TCT CGT GAT CAA GTT CTA TAC TTT GAC TTA
アンチセンス : TAA GTC AAA GTA TAG AAC TTG ATC ACG AGA TTT AAC GTT TAT

F 44 L I 53 N-S E B

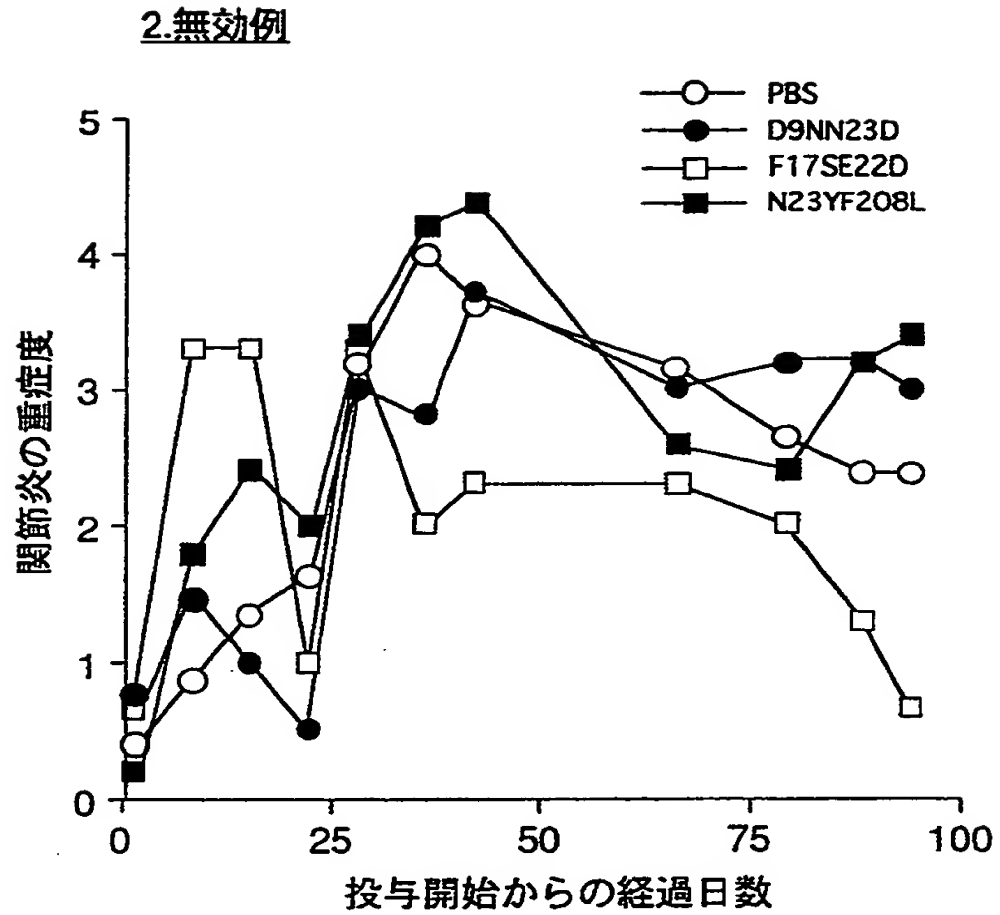
センス : AAA TCT ATA GAT CAA CTG CTA TAC TTT GAC TTA ATA TAT TCT
AAC AAG GAC ACT AAG TTA
アンチセンス : TAA CTT AGT GTC CTT GTT AGA ATA TAT TAA GTC AAA GTA TAG
CAG TTG ATC TAT AGA TTT

【図3】

1. 有効例



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 慢性関節リウマチ等の免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤を提供することを目的とする。

【構成】 アミノ酸置換が導入された黄色ブドウ球菌腸管内毒素B(*Staphylococcal enterotoxin B*; 以下SEBと略す)を大腸菌等宿主細胞で発現させ、精製してSEBの毒性を除去したSEB改変体を得る。これを構成主要成分とし、必要に応じゼラチン、塩、糖またはアミノ酸などの好適な安定化剤、賦形剤を添加して自己免疫疾患等の免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤を提供する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000173555
【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173555]

1. 変更年月日	1996年 3月 4日
[変更理由]	住所変更
住 所	熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
氏 名	財団法人化学及血清療法研究所

THIS PAGE BLANK (USPTO)